Temperaturabhängigkeit des aktiven Kationentransportes der Bäckerhefe

INAGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Wolfgang Fuchs

Saarbrücken

1971

Druck:
Universitätsbibliothek Saarbrücken

Aus dem II. Physiologischen Institut
der Universität des Saarlandes

Direktor: Prof. Dr. rer. nat. H. PASSOW

Temperaturabhängigkeit des aktiven Kationentransportes der Bäckerhefe

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
der Universität des Saarlandes

1971

vorgelegt von
Wolfgang Fuchs
geboren am 10.3.1943 in Neunkirchen/Saar

Dekan: Prof. Dr. med. H. KULENKAMPFF
Referent: Prof. Dr. rer. nat. H. PASSOW

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die mündliche Promotionsprüfung wurde am 5.11.1971 abgelegt.

E I N L E I T U N G

FORMULIERUNG UND ERLÄUTERUNG DER FRAGESTELLUNG

Gewöhnliche Bäckerhefe (Saccharomyces cerevisiae) hat auf Grund der Wachstumsbedingungen einen intrazellulären Kaliumgehalt von 150 mMol/l Zellen. Während metabolisch inaktive Zellen für Kationen fast impermeabel sind und selbst in destilliertem Wasser nur sehr langsam Kalium verlieren, kann bei Glucoseutilisation Kalium entgegen einem Gradienten von 5000:1 aus dem Medium aufgenommen werden (ROTHSTEIN, 1955). Die Beobachtung, daß dasselbe Transportsystem, wie die gegenseitige Hemmung zeigt, außer K^+ auch Na^+, Li^+, Cs^+ und Rb^+ aktiv transportiert, führte zu der Vorstellung eines Carriertransportes, der kinetisch mit der Michaelis-Menten-Gleichung beschrieben werden kann. Die Affinität für Alkali-Ionen nimmt vom Kalium über Rubidium, Caesium, Natrium und Lithium im Verhältnis 100:50:8:3:2 ab (CONWAY und DUGGAN, 1958, ROTHSTEIN und BRUCE, 1958, ARMSTRONG und ROTHSTEIN, 1964).

In der vorliegenden Arbeit soll die Temperaturabhängigkeit dieses aktiven Kationentransportes untersucht werden. Eine Änderung der Temperatur wird mindestens zwei für den Transport wichtige Eigenschaften beeinflussen: die Beladung des Carriers mit Substrat und die Geschwindigkeit, mit welcher der beladene Carrier durch die Membran hindurchtritt.

In Analogie zur Enzymkinetik, wo die Bildungswärme des Enzym-Substrat-Komplexes und die Aktivierungsenergie des Komplexes interessieren (GIBSON, 1953), muß man für den aktiven Transport die Wärmetönung der Reaktion des Carriers mit dem Substrat und die scheinbare Aktivierungsenergie für den Membrandurchtritt unterscheiden. Bei Gültigkeit der Michaelis-Menten-

Kinetik

$$(1) \qquad v = V_{max} \cdot \frac{S}{K_M + S}$$

sind die Wärmetönung und die scheinbare Aktivierungsenergie dadurch zu erhalten, daß man

$$(2) \qquad \ln V_{max} = \frac{E_A}{RT} + \ln V_o$$

$$(3) \qquad \ln K_m = \frac{\triangle H}{RT} + \ln K_o \qquad (+)$$

als Arrhenius-Plot aufträgt. Nun haben aber ARMSTRONG und ROTHSTEIN (1964, 1967) gezeigt, daß in Gegenwart von Inhibitoren das Transportverhalten der Hefezellen keiner einfachen Carrier-Kinetik gehorcht, und rein qualitativ ein Transportsystem mit einer 'transport-site' und einer 'modifier-site' beschrieben.

Die Herleitung einer Transportgleichung für eine solche Carrier-Modifier-Kinetik ergibt für eine einzige Ionensorte

$$(4) \qquad v = \frac{(S)V1/Cs + (S)^2 V2/Cs' \cdot Ms}{1 + (S)/Cs + (S)/Ms + (S)^2/Cs' \cdot Ms}$$

Die Begründung ist dem Anhang zu entnehmen. Dort ist auch gezeigt, daß diese Beziehung in eine Michaelis-Menten-Gleichung übergeht für den Fall, daß V1 = V2 und Cs = Cs'. Auch wenn diese Annahme für eine einzelne Temperatur gültig sein mag, darf sie bei Temperaturänderung nicht ohne weiteres bei-

(+) K_o und V_o sind temperaturunabhängige Konstanten.

behalten werden, womit sich die Anwendung von (2) und (3) verbietet.

Aus (4) ist aber auch zu entnehmen, daß bei geringer Substratkonzentration diese Gleichung durch Wegfall der Glieder in S^2 in eine Grenzform übergeht, die formal identisch ist mit einer Michaelis-Menten-Gleichung.

$$v = \frac{S \cdot V1/Cs}{1 + S(1/Cs + 1/Ms)}$$

In einer Lineweaver-Burk Auftragung sollte man daher Kurven finden, die bei niedrigen Substratkonzentrationen in Geraden übergehen. Aus der Neigung dieses geraden Abschnittes kann man dann ableiten:

$$(5) \qquad \ln \frac{V1}{Cs} = \ln \frac{V1_o}{Cs_o} + \frac{H1 - \triangle E1}{RT}$$

Damit ergibt sich die Möglichkeit, die relativen Größen von $\triangle H$ und $\triangle E$ zu bestimmen, d.h. praktisch, inwieweit eine Änderung des Dissoziationsgrades des Carriers mit zunehmender Temperatur durch eine Zunahme des Turnovers der beladenen Carriermoleküle kompensiert werden kann.

Zur Beantwortung der Fragestellung ist es notwendig, die Konzentrationsabhängigkeit des Carriertransportes bei mehreren Temperaturen zu messen. Rubidium wurde anstelle von Kalium gewählt, weil die Rubidiumaufnahme durch flammenphotometrische Analyse des Zellinhaltes gemessen werden kann. Die Kaliumaufnahme kann nur mit einem Tracer bestimmt werden, weil dem aktiven Transport ein passiver Verlust entgegensteht. Die flammenphotometrische Analyse würde den Nettofluß anstelle des Einwärtstransportes erfassen (ROTHSTEIN und BRUCE, 1958a). Da die intrazelluläre

Rubidiumkonzentration bei Versuchsbeginn Null ist, ist der Verlust durch das Leck zu vernachlässigen, und man erhält außerdem, von sehr niedrigen Temperaturen abgesehen, im Laufe des Experimentes genügend große prozentuale Änderungen des Rubidiumgehaltes.

Neben der Beantwortung der gestellten Fragen wird in der Diskussion das ARMSTRONG-ROTHSTEIN-Modell des aktiven Transportes an Hand der eigenen Versuchsergebnisse kritisch diskutiert.

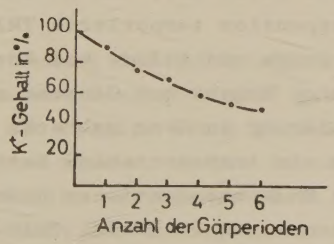
MATERIAL UND METHODEN

HERKUNFT UND VORBEHANDLUNG DER HEFE

Die Bäckerhefe (Deutsche Hefewerke G.m.b.H. Ludwigshafen) wurde am Tage der Anlieferung beim Großhändler abgeholt, mit destilliertem Wasser aufgeschwemmt und durch wiederholtes Abzentrifugieren und Resuspendieren in aqua dest. gewaschen. Dabei können die toten Zellen, die als schwarze Schicht auf dem Sediment in Erscheinung treten, jeweils abgetrennt werden.

Bei der anschließenden Vorbehandlung wurde von der Tatsache Gebrauch gemacht, daß Hefezellen beim Gären in destilliertem Wasser Kalium aus dem Zellinneren verlieren (ROTHSTEIN und BRUCE, 1958). Durch Aneinanderreihen von 20-minütigen Gärperioden bei 20°C und einem pH von rund 4, gerechnet jeweils von der Zugabe von 50 mMol Glucose pro Liter Suspension bis zum Abzentrifugieren und Resuspendieren, kann der intrazelluläre Kaliumgehalt auf etwa die Hälfte reduziert werden (Abb. 1), was sich für die flammenphotometrische Bestimmung der geringen Rb-Konzentrationen als Vorteil erweist.

Abb. 1:



Um die aktive Rubidiumaufnahme bei konstanter Glucosekonzentration messen zu können, wurde das endogene Substrat dadurch abgebaut, daß die Hefesuspension für 12 bis 24 Stunden belüf-

tet wurde. Nach mehrmaligem Waschen wurde die auf diese Weise erhaltene Stammsuspension im Kühlraum aufbewahrt und für die nächsten Tage als Ausgangsmaterial verwandt.

Auch bei der Lagerung in der Kälte tritt im Laufe der Zeit Kalium aus den Hefezellen aus, wenn auch nur in geringen Spuren. Deshalb wurde die benötigte Hefemenge erst unmittelbar vor Versuchsbeginn abgetrennt, 5 mal gewaschen und der Zellgehalt der Suspension mit der Hämatokrit-Methode bestimmt. Das in der Zellpackung vorhandene Wasser wurde mit 25 % berücksichtigt (CONWAY und DOWNEY, 1950). Die für den Versuch erforderliche Konzentration wurde durch Zugabe von eiskaltem aqua dest. eingestellt und abgemessene Volumina bis zum Versuchsbeginn im Eisbad aufbewahrt.

VERSUCHSANORDNUNG

Bei der Messung der Transportgeschwindigkeit wurde so vorgegangen, daß zu verschiedenen Zeiten nach Versuchsbeginn die intrazelluläre Rb-Konzentration flammenphotometrisch bestimmt und aus der Neigung der Konzentrations-Zeit-Kurve in der ersten Minute die Transportrate errechnet wurde. Im einzelnen heißt das, daß zu der konzentrierten eiskalten Hefesuspension temperierte TRIS-HCl-Lösung als Puffer zugegeben wurde und sofort bei Erreichen der Versuchstemperatur durch Zugabe von Glucose und Rubidiumchlorid einerseits die Gärung in Gang gebracht und andererseits dem Transportsystem ein transportables Kation zur Verfügung gestellt wurde. Die Endkonzentrationen betrugen 20 mg/ml Hefe, 50 mMol/l Glucose und 25 mMol/l TRIS-HCl pH 7,5.

Da die Elektroneutralität während des Kationentransportes dadurch aufrechterhalten wird, daß H^+-Ionen gegen Rb^+-Ionen ausgetauscht werden, extrazelluläre H^+-Ionen aber den Rubidiumtransport hemmen, ist es unumgänglich, den pH-Wert des

Mediums während der Versuchsperiode konstant zu halten. Hierfür reicht die Pufferkapazität der TRIS-HCl in einer Konzentration von 25 mMol/l nicht aus. Der pH-Wert mußte deshalb mit Hilfe eines pH-Staten (Radiometer) durch Zutitration von konzentrierter TRIS-Lösung (pH 12) konstant gehalten werden. Kleinere Schwankungen um den Sollwert von pH 7,5 sind unbedeutend, da der Einfluß der H^+-Ionen zwischen pH 6 und pH 8 konstant und zu vernachlässigen ist (ARMSTRONG und ROTHSTEIN, 1964).

Zur Rubidiumbestimmung wurden in geeigneten Intervallen nach dem Start jeweils 3 ml Suspension entnommen und auf ein Millipore-Filter gegeben. Durch Zugabe von 30 ml eiskalter NaCl-Lösung (10 mMol/l) wurde sowohl der aktive Transport gestoppt, als auch die Rb-Konzentration des Außenmediums drastisch gesenkt und gleichzeitig eventuell absorbiertes Rb^+ gegen Na^+ ausgetauscht. Nach dem Abfiltrieren wurde der trockene Rückstand mit aqua dest. abgespült und 3 Minuten gekocht. Dabei platzen die Hefezellen und die Elektrolytkonzentration des Zellinneren kann nach Auffüllen auf konstante Volumina gemessen werden.

ANALYSE

Die flammenphotometrische Bestimmung des Rubidiumgehaltes im Zellinneren erfordert besondere Sorgfalt, weil geringe Rubidiumanteile in Gegenwart von relativ hohen Kaliumkonzentrationen nachgewiesen werden müssen. Da das Rubidiumfilter aber auch für das vom Kalium emittierte Licht durchlässig ist, bzw. Kalium auch Licht der durchgehenden Wellenlänge emittiert (780 nm), beeinflussen Schwankungen der Kaliumkonzentration die mit dem Rubidiumfilter gemessene Lichtintensität. Diese als Querempfindlichkeit beschriebenen Störungen lassen sich dadurch ausschalten, daß man annimmt, daß die mit dem Rubidiumfilter gemessene Emission sich entsprech-

end der Empfindlichkeit aus einem Rubidium- und einem Kaliumanteil zusammensetzt (HERRMANN und ALKEMADE, 1960).

$$(a) \quad E_{Rb} = \alpha_{Rb}(K) + \beta_{Rb}(Rb) \qquad (+)$$

Ebenso ist die mit dem Kaliumfilter gemessene Emission gleich der Empfindlichkeit für Kalium mal der Kaliumkonzentration plus der Empfindlichkeit des Kaliumfilters für Rubidium mal der Rubidiumkonzentration.

$$(b) \quad E_{K} = \alpha_{K}(K) + \beta_{K}(Rb)$$

Die Anwendung der Beziehungen (a) und (b) macht es erforderlich, daß die Emission einer Probe auch dann, wenn man nur die Rb-Konzentration bestimmen will, sowohl mit dem Rubidiumfilter als auch mit dem Kaliumfilter gemessen werden muß. Die Eichfaktoren α_K, α_{Rb}, β_K, β_{Rb} ergeben sich aus den Neigungen der Eichkurven, die auch wieder für jedes Filter mit beiden Elementen aufgenommen werden müssen.

Aus der Gestalt der Beziehungen (a) und (b) ist zu ersehen, daß sie nur dann anwendbar sind, wenn alle vier Eichkurven durch den Koordinatenursprung gehen und über den ganzen Bereich linear sind. Die experimentell gefundene Krümmung der Eichkurven und die unterschiedlichen Schnittpunkte mit der y-Achse konnten dadurch beseitigt werden, daß zu allen Proben und Eichlösungen soviel Caesiumchlorid zugefügt wurde, daß eine Endkonzentration von 2 mMol/l erreicht wurde. Wegen der geringen Ionisationsenergie des Caesiums wird durch das Einbringen von Caesium in die Flamme die Ionisation von Rb und K entsprechend der Saha-Gleichung zurückgedrängt. Dadurch gehen sie der Messung nicht mehr verloren, und man erhält eine lineare Beziehung zwischen Konzentration und Emission.

(+) Konzentrationen sind immer in runden Klammern geschrieben.

E R G E B N I S S E

Die durch das Experiment direkt erhaltene Information ist die intrazelluläre Rubidiumkonzentration zu verschiedenen Zeiten nach Versuchsbeginn. Die Abbildungen 2a, b, c und d geben den zeitlichen Verlauf der Rubidiumaufnahme bei 20°, 25°, 30° und 35°C wieder. Im Experiment entspricht der Versuchsbeginn dem Zeitpunkt, zu dem die Glucose zu der temperierten, gepufferten und RbCl enthaltenden Suspension zugegeben wurde.

Es ist zu sehen, daß der Transport beim Start nicht gleich mit maximaler Rate stattfindet, wie es für eine Enzymreaktion zu erwarten wäre. Bei niedrigen Temperaturen tritt vielmehr eine ausgeprägte Latenzperiode in Erscheinung, sei es dadurch, daß die Bereitstellung der Carriermoleküle verlangsamt wird, oder daß die Energie für den Transport verspätet zur Verfügung steht. Auf die nach 20 Minuten insgesamt akkumulierte Menge ist die Temperatur hingegen praktisch ohne Einfluß (Abb. 3).

Das Anwachsen der Transportrate im Verlauf des Experimentes macht die Entnahme einer Initialgeschwindigkeit aus den Abb. 2a - d unmöglich. Ein Analogon könnte allenfalls bei Kenntnis des Zeitverlaufs des Transportes errechnet werden. Diese Schwierigkeit kann experimentell dadurch vermieden werden, daß man durch Zugabe von Glucose den Stoffwechsel der ausgehungerten Zellen zunächst in Gang bringt und das zu transportierende Ion erst nach Ablauf der Latenzperiode zufügt. Als Indiz hierfür kann die beginnende Protonensekretion angesehen werden, die an der Zutitration von TRIS durch den pH-Staten leicht registriert werden kann. Für die benutzten Temperaturen verstreichen von der Zugabe der Glucose bis zur Zugabe des Rubidiums 0.5, 1, 1.5, 2, 3 und 5 Minuten.

Der bei Gärung in elektrolyt-freiem Wasser zu erwartende Kaliumaustritt (ROTHSTEIN und BRUCE, 1958) betrug für 35°C nach 30 Sekunden 0.05 mMol/l Medium und für 10°C nach 5 Minuten 0.02 mMol/l. Unter Berücksichtigung der in der Einleitung angegebenen Affinitäten wurde angenommen, daß die Hemmung des Rubidiumtransportes durch das Kalium von einem zehnfachen Rubidiumüberschuß an vernachlässigt werden darf.

Von den mit dieser Methode gemessenen Rubidiumaufnahmen ist für jede Temperatur ein Beispiel in der Abbildung 3 wiedergegeben. Man sieht, daß für niedrige Temperaturen die nach 10 Minuten akkumulierte Menge noch deutlich unter den für höhere Temperaturen gefundenen Werten liegt. Der insgesamt geringere Transport bei niedrigen Temperaturen macht die Analyse des Zellinhaltes schwierig und führt dazu, daß die Messungen unter 20°C zunehmend mit größeren Fehlern behaftet sind.

Die Mittelwerte der Anfangsgeschwindigkeiten, die aus Abb. 4 und weiteren Experimenten entnommen wurden (für 20, 25, 30 und 35°C je 4, für 15°C 2 Experimente) sind in Abb. 5 gegen die Rubidiumkonzentration des Außenmediums aufgetragen. Zusammen mit der doppelt reziproken Auftragung (Abb. 6) belegt sie, daß der Rubidiumtransport einer Sättigungskinetik folgt, die aber nur für kleine Substratkonzentrationen in eine Lineweaver-Burk-Gerade übergeht.

D I S K U S S I O N

Das überraschende Ergebnis der vorliegenden Untersuchung ist der Abb. 6 am deutlichsten zu entnehmen. Die beobachtete Sättigungskinetik folgt keinem einfachen Michaelis-Menten Verlauf und im Lineweaver-Burk-Plot werden keine Geraden erhalten. Für niedrige Temperaturen sind die Kurven für zunehmende Rubidiumkonzentrationen nach größeren Transportraten hin abgebogen. Bei hohen Rubidiumkonzentrationen führt die Erhöhung der Außenkonzentration also zu einer stärkeren Vergrößerung der Initialgeschwindigkeit als man es nach dem kinetischen Verhalten im Bereich mittlerer und kleiner Konzentrationen erwartet.

Diese Beobachtung ist mit einem einfachen Carrier-Transport nicht zu erklären; sie steht aber auch im Widerspruch zu dem von ARMSTRONG und ROTHSTEIN formulierten Carrier-Modifier-Modell, das für ein System mit nur einer Ionensorte eine Michaelis-Menten-Kinetik voraussagt. Zwar würden sich für 35°C die Ergebnisse durch eine Gerade fitten lassen, die Existenz abszissenkonkaver Kurven bei niedrigen Temperaturen verbietet aber auch in diesem Fall, daß die Neigung einfach gleich K_m/V_{max} und der Achsenabschnitt gleich $1/V_{max}$ gesetzt werden dürfen, da beide Parameter, je nach der zu Grunde gelegten Modellvorstellung, eine andere Bedeutung haben.

Die Auswertung der Ergebnisse hängt wesentlich ab von der Modellvorstellung, die man vom Transportmechanismus hat. Das beobachtete Verhalten läßt sich aber mit zwei unabhängigen und verschiedenen Carrier-Plätzen ebenso gut erklären wie mit der Existenz eines einzigen Carriers mit zwei Plätzen, zwischen denen Wechselwirkung möglich ist. Die beobachtete Steigerung der Transportrate wäre dann zurückzuführen entweder auf eine zunehmende Bevorzugung des

'rascheren Carriers' oder auf eine Abhängigkeit von Affinität und Maximalgeschwindigkeit von der jeweiligen Besetzung der beider Plätze des Carriers.

Eine solche Substrataktivierung wurde für die Urease und die Maleatdehydrogenase beschrieben (ALBERTY, MASSEY, FRIEDEN und FUHLBRIGGE, 1964). Die für dieses System entwickelte Geschwindigkeitsgleichung ist für hohe Substratkonzentrationen nur gültig, wenn man annimmt, daß die Produktbildung bei zusätzlicher Besetzung des benachbarten, nicht enzymatisch wirksamen Platzes, sehr viel größer ist als bei alleiniger Besetzung des Enzymplatzes (ALBERTY und BOCK, 1953). Die Annahme, daß V2 sehr viel größer ist als V1 darf aber nicht von vorneherein gemacht werden, wenn bei manchen Temperaturen fast eine Gerade erhalten wird.

Eine für den Alkalitransport an Hefezellen formulierte Kinetik muß die experimentellen Befunde mit Inhibitoren und das aus ihnen hervorgegangene Carrier-Modifier-Modell von ARMSTRONG und ROTHSTEIN berücksichtigen. Im Anhang ist gezeigt, daß dieses Modell bei Weglassen der Einschränkungen eine Substrataktivierung nicht ausschließt. Die ebenfalls im Anhang stehende Ableitung eines quantitativen Ausdrucks führt zu der schon in der Einleitung gegebenen Gleichung

$$(1) \qquad v = \frac{(S)V1/Cs + (S)^2 V2/Cs' \cdot Ms}{1 + (S)/Cs + (S)/Ms + (S)^2/Cs' \cdot Ms}$$

Sie beschreibt ein Zwei-Platz-Konzept mit Wechselwirkung ganz allgemein und ist zur Beschreibung einer Substrathemmung ebenso geeignet wie zur Beschreibung einer Substrataktivierung (FRIEDEN, 1964). Die speziellen Fälle ergeben sich aus der Konstellation der Konstanten. Für

(2) $V1/Cs \gg V2(S)/Ms \cdot Cs$

und

(3) $$\frac{Cs + Ms}{Cs \cdot Ms} \gg (S)/Ms \cdot Cs'$$

folgt

(4) $$v = \frac{(S)V1/Cs}{1 + (S)\left[Cs + Ms/Cs \cdot Ms\right]}$$

$$= \alpha \cdot (S)/1 + \beta \cdot (S)$$

Die Bedingungen (2) und (3) sind praktisch erfüllt, wenn S sehr klein wird. Im Lineweaver-Burk-Plot erwartet und findet man in diesem Konzentrationsbereich eine Gerade (Abb. 6). Aus der Neigung $1/\alpha = Cs/V1$ ergibt sich

(5) $$\ln 1/\alpha = \ln Cs_o/V1_o + \triangle E1 - \triangle H1/RT$$

wenn man annimmt, daß

(6) $$Cs = Cs_o \cdot \exp(-\triangle H1/RT)$$

und

(7) $$V1 = V1_o \cdot \exp(-\triangle E/RT)$$

sind, wo $\triangle H1$ die Reaktionsenthalpie für die Bindung des Rubidiums an den Carrierplatz und $\triangle E$ die scheinbare Aktivierungsenergie für den Durchtritt darstellen.

Betrachten der Abb. 6 zeigt, daß $1/\alpha$ für alle Temperaturen, für die der Grenzfall einer Geraden erreicht wird, denselben Wert hat. Aus dem horizontalen Verlauf in Abb. 9

folgt also, daß $\Delta E = \Delta H$ ist, d.h. die Abnahme der Beladung des Carriers mit zunehmender Temperatur wird durch Erhöhung der Geschwindigkeit des Transportes beladener Carriermoleküle kompensiert. Dabei muß offenbleiben, ob E sich auf die Geschwindigkeit des Transfers eines beladenen Carriermoleküls oder auf die Änderung der Zahl der zur Verfügung stehenden Carriermoleküle oder auf beides bezieht.

Aus dem Grenzfall für sehr kleine S ergibt sich

(8) $v = (S)V1/Cs$

und es folgt mit (6) und (7)

(9) $\log v = \log(V1_o/K1_o) + \log(S) + (\Delta H1 - \Delta E1)/RT$

Die Abb. 8 zeigt, daß die Steigungen für kleine S und hohe Temperaturen die Tendenz haben, gegen Null zu gehen, d.h. $\Delta H1 = \Delta E1$. Dieser Grenzwert wird bei einer Außenkonzentration von 0.5 mMol/l Rubidium, die wegen der Konkurrenz des austretenden Kaliums nicht unterschritten werden darf, allerdings noch nicht erreicht.

Die Bestimmung der anderen Konstanten ist sehr schwierig. Der Ordinatenabschnitt β/α ergibt (10)

$$\beta/\alpha = \frac{Cs_o \cdot \exp(-\Delta H1/RT) + Ms_o \cdot \exp(-\Delta H_2/RT)}{V1_o \cdot Cs_o} \cdot \exp(\Delta E_1 + \Delta H_2/RT)$$

Trägt man $\log\beta/\alpha$ gegen $1/T$ auf, wie es in Abbildung 8 geschehen ist, und lassen sich die Punkte mit einer Geraden fitten, so kann man zwar schließen, daß

$Cs_o \cdot \exp(-\triangle H1/RT)$ und $Ms_o \cdot \exp(-\triangle H2/RT)$

von unterschiedlicher Größenordnung sind, eine Bestimmung einzelner Werte ist jedoch unmöglich. Auch die Absolutgrößen von $\triangle E1$ und $\triangle H1$ müssen unbekannt bleiben, weil die begrenzte Anzahl der Meßpunkte einen Gauß-Fit nicht erlaubt.

A N H A N G

BEGRÜNDUNG UND HERLEITUNG EINER TRANSPORTGLEICHUNG FÜR EINE CARRIER-MODIFIER-KINETIK BEI ANWESENHEIT EINES INHIBITORS

Daß die Carrier-Hypothese in der einfachen Form zur Beschreibung des Alkali-Transportes nicht ausreicht, wurde von ARMSTRONG und ROTHSTEIN (1964, 1967) für den Fall angegeben, daß der Einwärtstransport bei niedrigem pH oder in Gegenwart einer zweiten Alkalisorte gemessen wurde. Ihre Versuchsergebnisse, die die Modifikation des Transportmodells notwendig machten, sind - ihrer grundsätzlichen Bedeutung wegen - in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt:

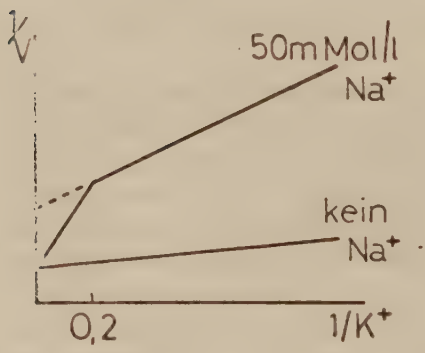


Abb. 10a

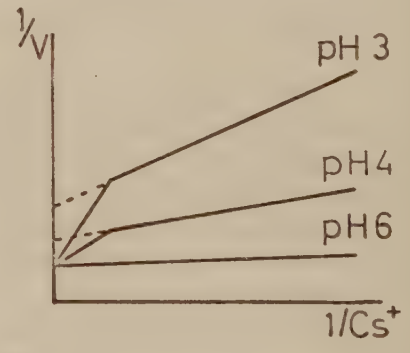


Abb. 10b

Na^+ in relativ hoher Konzentration hemmt den Kaliumtransport bis zu einer K^+-Konzentration von 5 mMol/l 'nicht kompetitiv'. Die Erhöhung der Kaliumkonzentration über diesen Wert hinaus macht die Hemmung aber rückgängig, so daß eine Extrapolation auf das gleiche V_{max} möglich ist, das in Abwesenheit von Natrium gefunden wird. Abb. 10b zeigt die

'nicht kompetitive' Hemmung der H^+-Ionen bei niedrigen Caesium-Konzentrationen und den Übergang in eine 'kompetitive' Hemmung im Bereich höherer Konzentrationen. Der Einfluß von Cs^+ und Ca^{++} auf den Kaliumtransport ist den Abbildungen 10a und 10b analog.

Das von ARMSTRONG und ROTHSTEIN (1964, 1967) für dieses Verhalten vorgeschlagene Transportmodell ist durch folgende Annahmen charakterisiert:

I. C und M sind zwei unabhängige Bindungsstellen für Kationen, wobei C für den Carrierplatz und M für einen nicht transportierenden Modifierplatz steht.

II. Alle Alkali-Ionen, sowie H^+ können mit beiden Liganden reagieren.

III. C und M haben ein verschiedenes Affinitätsmuster für die Kationen.

IV. Mg^{++} und Ca^{++} reagieren in üblichen Konzentrationen nur mit dem Modifier.

V. Wenn nur C oder beide C und M mit der gleichen Ionensorte besetzt sind, folgt deren Einwärtstransport der einfachen Michaelis-Menten-Kinetik.

VI. Besetzung des Carriers mit einer Ionensorte, deren Aufnahme nicht gemessen wird (Inhibitor), führt zu einer kompetitiven Hemmung des Substrattransportes.

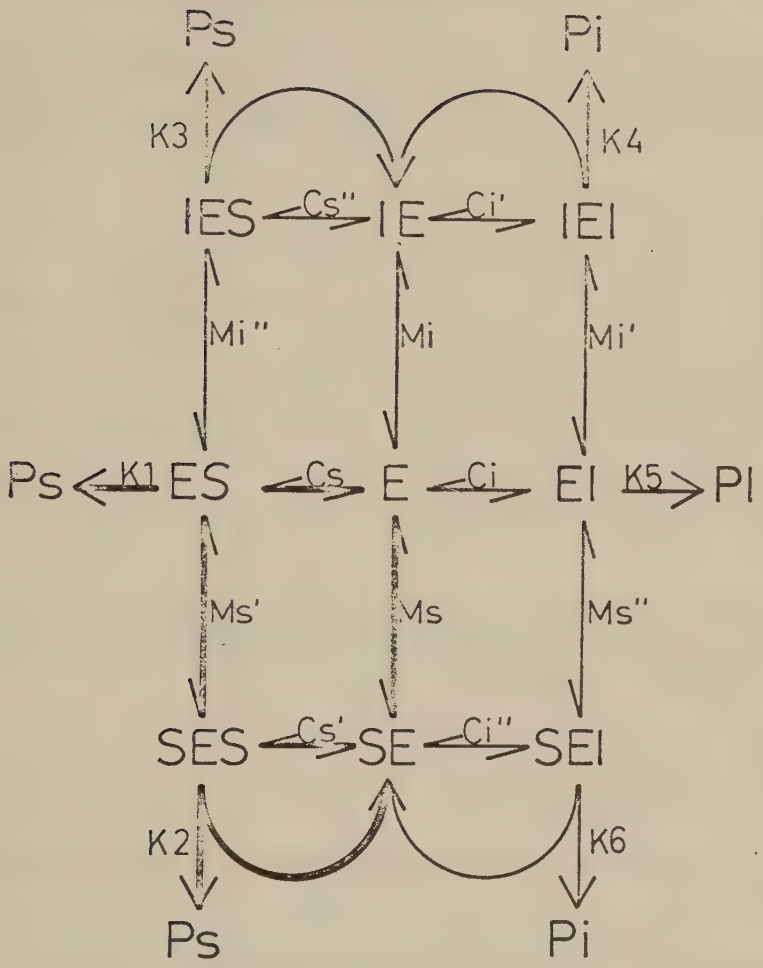
VII. Reagiert der Inhibitor mit dem Modifierplatz, führt das in der Regel zu einer nicht kompetitiven Hemmung der transportierten Ionensorte ohne gleichzeitigen Transport des Inhibitors.

VIII. Da angenommen wird, daß alle Kationen mit dem Modifierplatz reagieren können, führt die Erhöhung der Substratkonzentration auch zu einer zunehmenden Besetzung des Modifierplatzes mit Substrat bei gleichzeitiger Verdrängung des Inhibitors und Reversion der nicht kompetitiven Hemmung.

Im Rahmen dieses Carrier-Modifier-Modells läßt sich das in Abb. 10a wiedergegebene Transportverhalten mit der Annahme verstehen, daß Na^+ eine größere Affinität zum Modifier hat als Kalium, dessen Affinität zum Carrier größer sein soll als die zum Modifier. Bei niedriger Substratkonzentration wäre der Modifier dann von Na^+ besetzt, was zu einer Erniedrigung der Maximalgeschwindigkeit des Kaliumtransportes führt. Eine Erhöhung der Kaliumkonzentration führt entsprechend den pK-Werten zunächst vorrangig zu einer Reaktion mit dem Carrier und erst sehr hohe K^+ Konzentrationen wären in der Lage, Na^+ vom Modifier zu verdrängen, wodurch unter Aufhebung der nicht kompetitiven Hemmung das gleiche V_{max} erreicht wird wie in Abwesenheit von Na^+. Die Argumentation bei den anderen Ionengruppierungen ist analog.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen nun, daß man das Transportverhalten der Hefezellen auch in Abwesenheit von Inhibitoren und bei einem konstanten pH von 7.5 mit der Michaelis-Menten-Gleichung nicht befriedigend beschreiben kann, was der Annahme V. widerspricht, die für ein System, im dem nur ein Elektrolyt vorhanden ist, eine Michaelis-Menten-Kinetik voraussagt.

Geht man über die rein qualitative Argumentation von ARMSTRONG und ROTHSTEIN hinaus und formuliert für das Carrier-Modifier-Modell eine Geschwindigkeits-Konzentration-Beziehung, so gilt das umseitige Reaktionsschema (dicke und dünne Linien).


Ps
Pi
K3
K4
IES
Cs''
IE
Ci'
IEI
Mi''
Mi
Mi'
Ps
K1
ES
Cs
E
Ci
EI
K5
PI
Ms'
Ms
Ms''
SES
Cs'
SE
Ci''
SEI
K2
K6
Ps
Pi

Wenn Substrat und Inhibitor sowohl mit dem Carrierplatz als auch mit dem Modifierplatz reagieren können, die als rechter bzw. linker Ligand des Transportsystems geschrieben werden sollen (LAIDLER, 1958) (S-E-) bzw. (-E-S), dann kann das Transportsystem in 8 Beladungszuständen existieren:

(1) $E + S \longrightarrow ES$

(2) $E + S \longrightarrow SE$

(3) $SE + S \longrightarrow SES$

(4) $E + I \longrightarrow EI$

(5) $E + I \longrightarrow IE$

(6) $IE + I \longrightarrow IEI$

(7) $IE + S \longrightarrow IES$

(8) $SE + I \longrightarrow SEI$

Da Transport nur bei Besetzung des Carrierplatzes stattfinden kann, gilt, wenn man das intrazellulär erscheinende Substrat mit Ps kennzeichnet:

(9) $ES \xrightarrow{K1} E + Ps$

(10) $SES \xrightarrow{K2} E + Ps$

(11) $IES \xrightarrow{K3} E + Ps$

Für die initiale Transportgeschwindigkeit erhält man entsprechend [+]

(12) $Vs = dPs/dt = K1(ES) + K2(SES) + K3(IES)$

Nimmt man an, daß sich die aus (1) - (8) ergebenden Gleichgewichtsreaktionen

[+]Für Konzentrationen werden runde Klammern geschrieben.

$$(1a) \qquad (E)(S)/(ES) = Cs$$

$$(2a) \qquad (E)(S)/(SE) = Ms$$

$$(3a) \qquad (SE)(S)/(SES) = Cs'$$

$$(4a) \qquad (E)(I)/(EI) = Ci$$

$$(5a) \qquad (E)(I)/(IE) = Mi$$

$$(6a) \qquad (IE)(I)/(IEI) = Ci'$$

$$(7a) \qquad (IE)(S)/(IES) = Cs''$$

$$(8a) \qquad (SE)(I)/(SEI) = Ci''$$

rasch einstellen, so wird die Zerfalls- oder Transportkonstante geschwindigkeitsbestimmend. Unter Berücksichtigung der Massenbilanz

$$(13) \quad (E_o) = (E) + (ES) + (SE) + (SES) + (EI) + (IE) + (IEI) + (IES) + (SEI)$$

$$(14) \quad (E_o) = E\left[1 + (S)/Cs + (S)/Ms + (S)^2/Ms\cdot Cs' + (I)/Ci + (I)/Mi + (I)^2/Mi\cdot Ci' + (I)(S)/Ms\cdot Ci'' + (I)(S)/Mi\cdot Cs''\right.$$

erhält man nach Schreiben von

$$(15) \quad V1 = K1(E_o); \quad V2 = K2(E_o); \quad V3 = K3(E_o)$$

als Geschwindigkeits-Konzentrations-Beziehung für ein Carrier-Modifier-System im allgemeinen Fall die Gleichung

$$(16) \quad Vs = \frac{(S)\left[V1/Cs + \right.}{1 + (I)/Ci + (I)/Mi + (I)^2/Mi\cdot Ci' + (S)\left.\right]} \; \frac{V3(I)/Mi\cdot Cs''\Big] +}{1/Cs + 1/Ms + (I)/Ms\cdot Ci'' + (I)/Mi\cdot Cs''}$$

$$(16) \qquad \frac{(S)^2 \; V2/Cs' \cdot Ms}{+ (S)^2/Ms \cdot Cs'}$$

Unter Berücksichtigung der Annahme V. von ARMSTRONG und ROTHSTEIN, daß keine Wechselwirkung eintritt, wenn M und C mit der gleichen Ionensorte besetzt sind und daß außerdem der 'substratmodifizierte' und der 'modifierplatz-unbesetzte' Carrier (SES und ES) gleichschnell durch die Membran wandern, fallen einige Konstanten fort, und man erhält aus (16) unter der Bedingung, daß

(17) $V1 = V2$ und $Cs = Cs'$ bzw. $Ci = Ci'$

$$(18) \qquad Vs = \frac{(S)\left[V1/Cs + V3(I)/Mi \cdot Cs''\right]}{1 + (I)/Ci + (I)/Mi + (I)^2/Mi \cdot Ci + (S)\left[1/Cs + (S)^2 V1/Cs \cdot Ms\right]}{+ 1/Ms + (I)/Ms \cdot Ci'' + (I)/Mi \cdot Cs''\Big] + (S)^2/Cs \cdot Ms}$$

Es ist einfach herzuleiten, daß diese Gleichung für (I) = 0 eine Michaelis-Menten-Gleichung ergibt:

$$(19) \qquad Vs = \frac{(S)V1/Cs \;\; 1 + (S)/Ms}{1 + (S)/Cs \;\; 1 + (S)/Ms}$$

$$\text{oder} \quad Vs = \frac{V1 \cdot S}{Cs + S}$$

HERLEITUNG EINER TRANSPORTGLEICHUNG FÜR EINE CARRIER-MODIFIER-KINETIK IN ABWESENHEIT EINES INHIBITORS

Formuliert man dem Vorangegangenen entsprechend das Zwei-Platz-Konzept nur für das Substrat, so erhält man nur den dick ausgezogenen Teil des Reaktionsschemas. Von den Beziehungen bleiben nur 1, 2, 3, 9, 10 und 1a, 2a und 3a

gültig. Die Massenbilanz reduziert sich zu

$$(20) \quad (E_o) = (F) + (ES) + (SE) + (SES)$$

und man erhält als Transportgleichung für den allgemeinen Fall:

$$(21) \quad V = \frac{(S)V1/Cs + (S)^2V2/Cs' \cdot Ms}{1 + (S)/Cs + (S)/Ms + (S)^2/Cs' \cdot Ms}$$

Aus (21) ist ohne weiteres zu entnehmen, daß eine Auftragung von $1/V$ gegen $1/(S)$ wegen der Glieder in $(S)^2$ ein nicht-lineares Kurvenbild ergibt, obwohl nur eine einzige Ionensorte im System vorhanden ist.

Auch in Abwesenheit eines Inhibitors erhält man eine Michaelis-Menten-Gleichung wieder nur mit der einschränkenden Annahme, daß

$$(22) \quad V1 = V2 \text{ und } Cs = Cs'$$

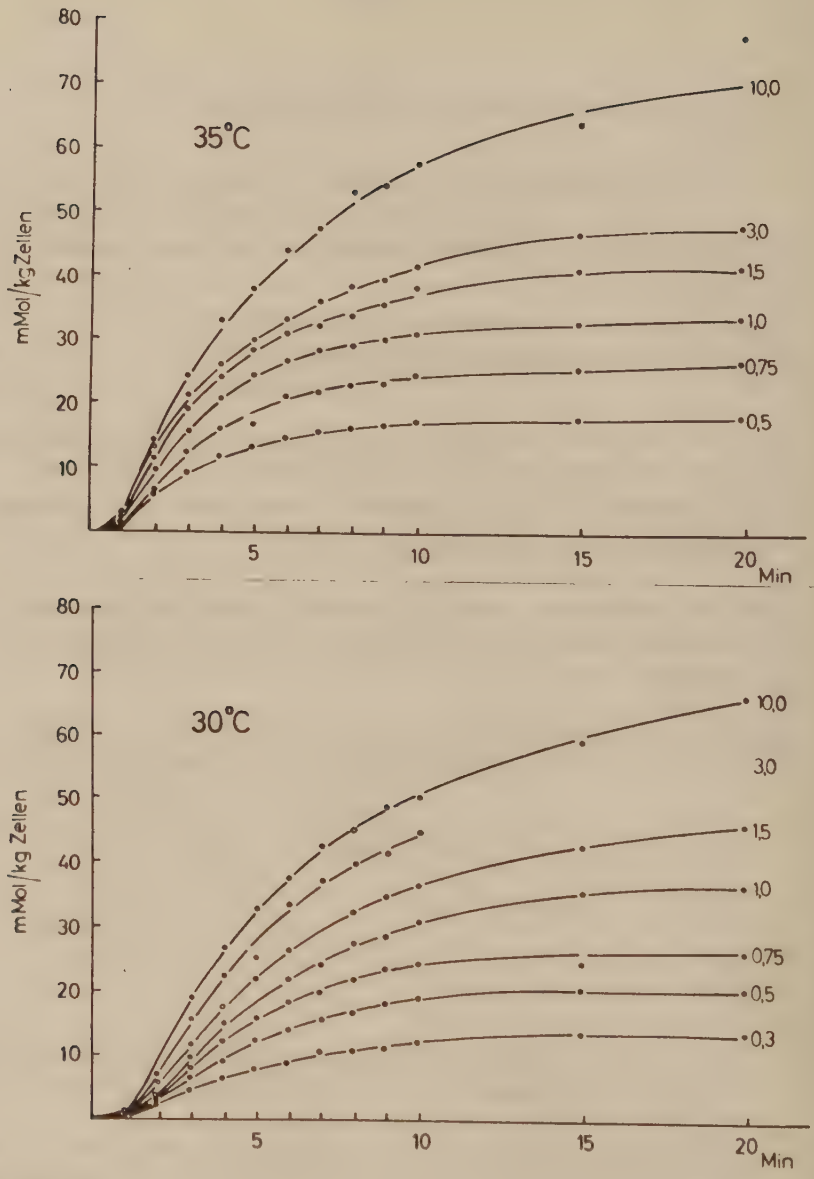


Abb. 2a, b

Akkumulierte Menge (mMol/kg Zellen) bei Start mit Glucose in Abhängigkeit von den Außenkonzentrationen (mMol/l).

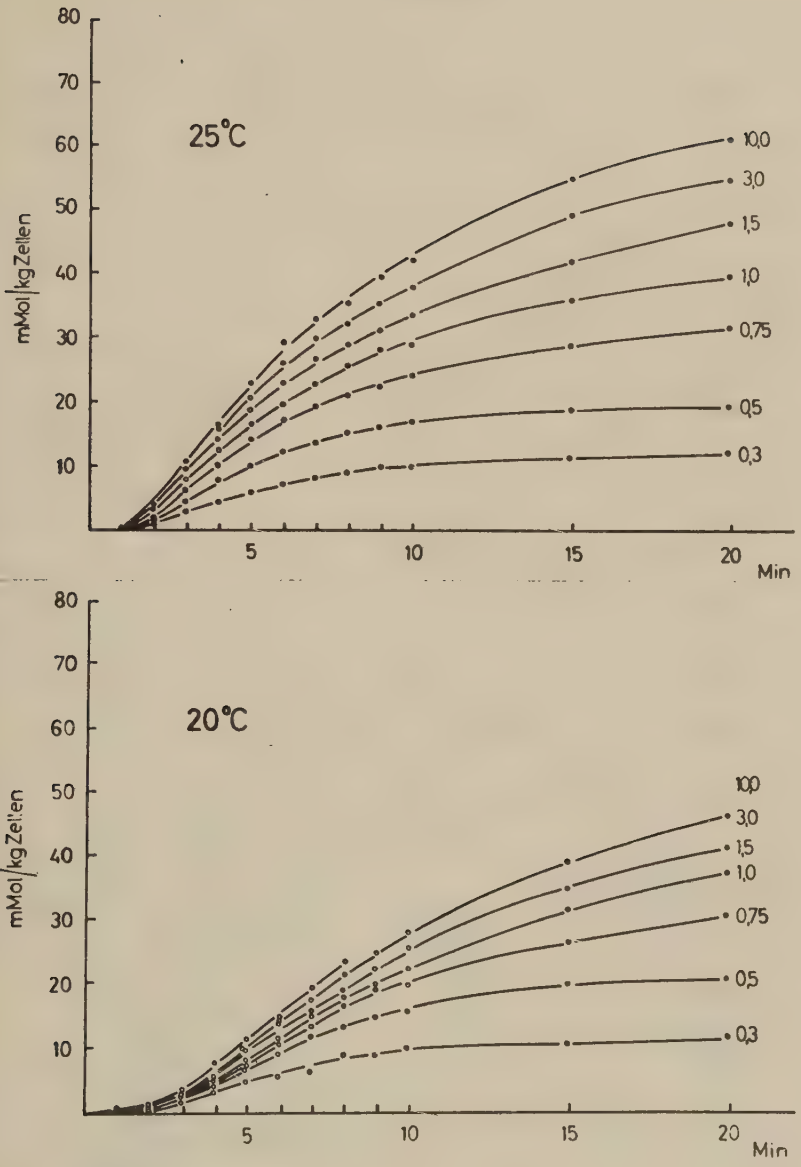


Abb. 2c, d

Akkumulierte Menge (mMol/kg Zellen) bei Start mit Glucose in Abhängigkeit von den Außenkonzentrationen (mMol/l).

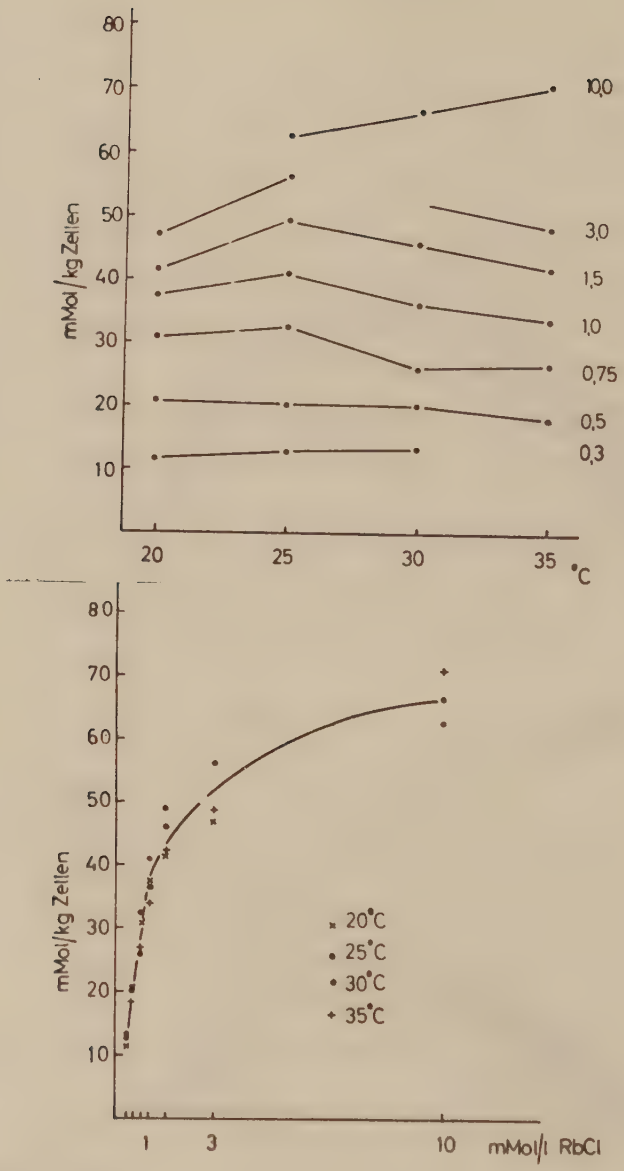


Abb. 3a, b

Abhängigkeit der insgesamt akkumulierten Menge von der Außenkonzentration und der Temperatur.

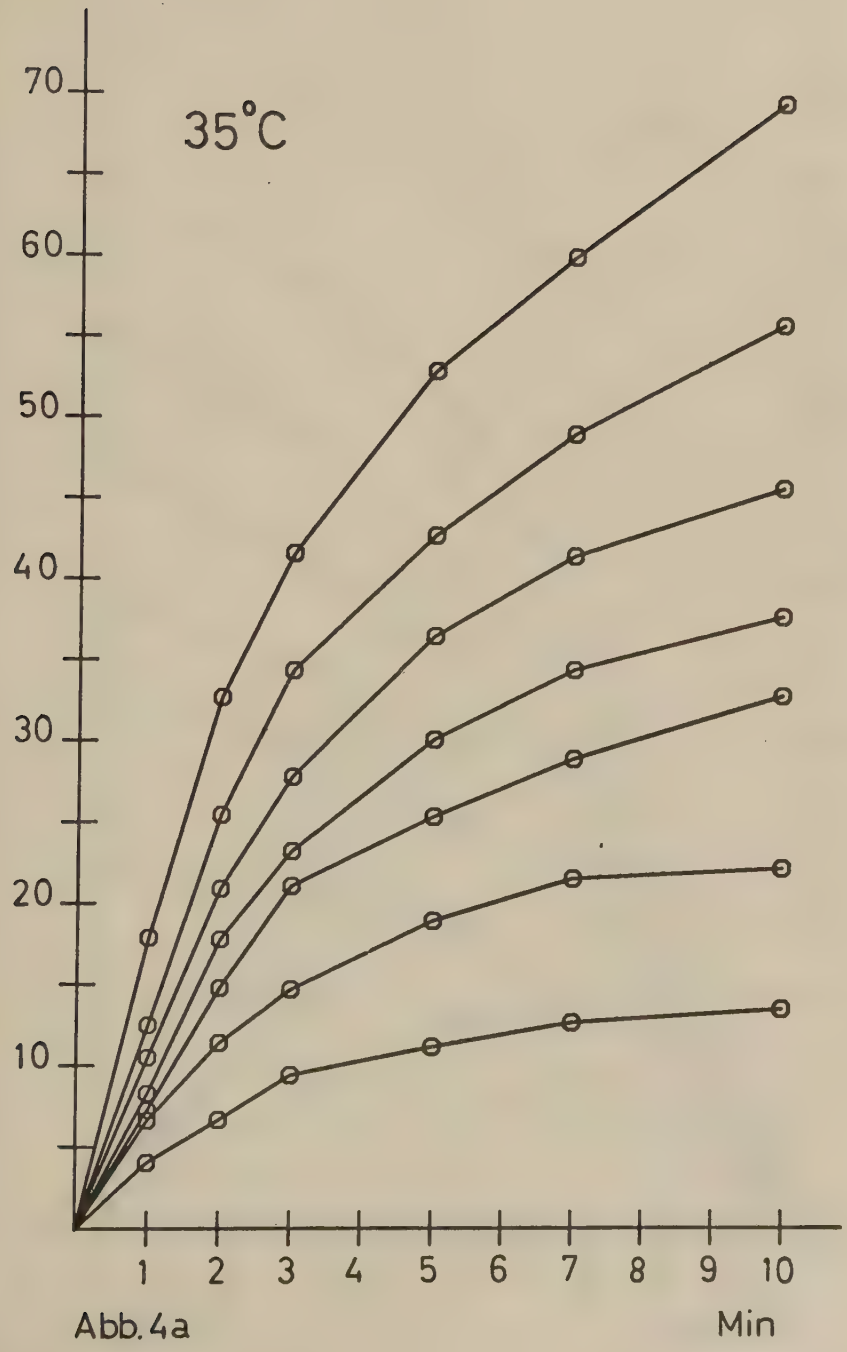


Abb. 4a

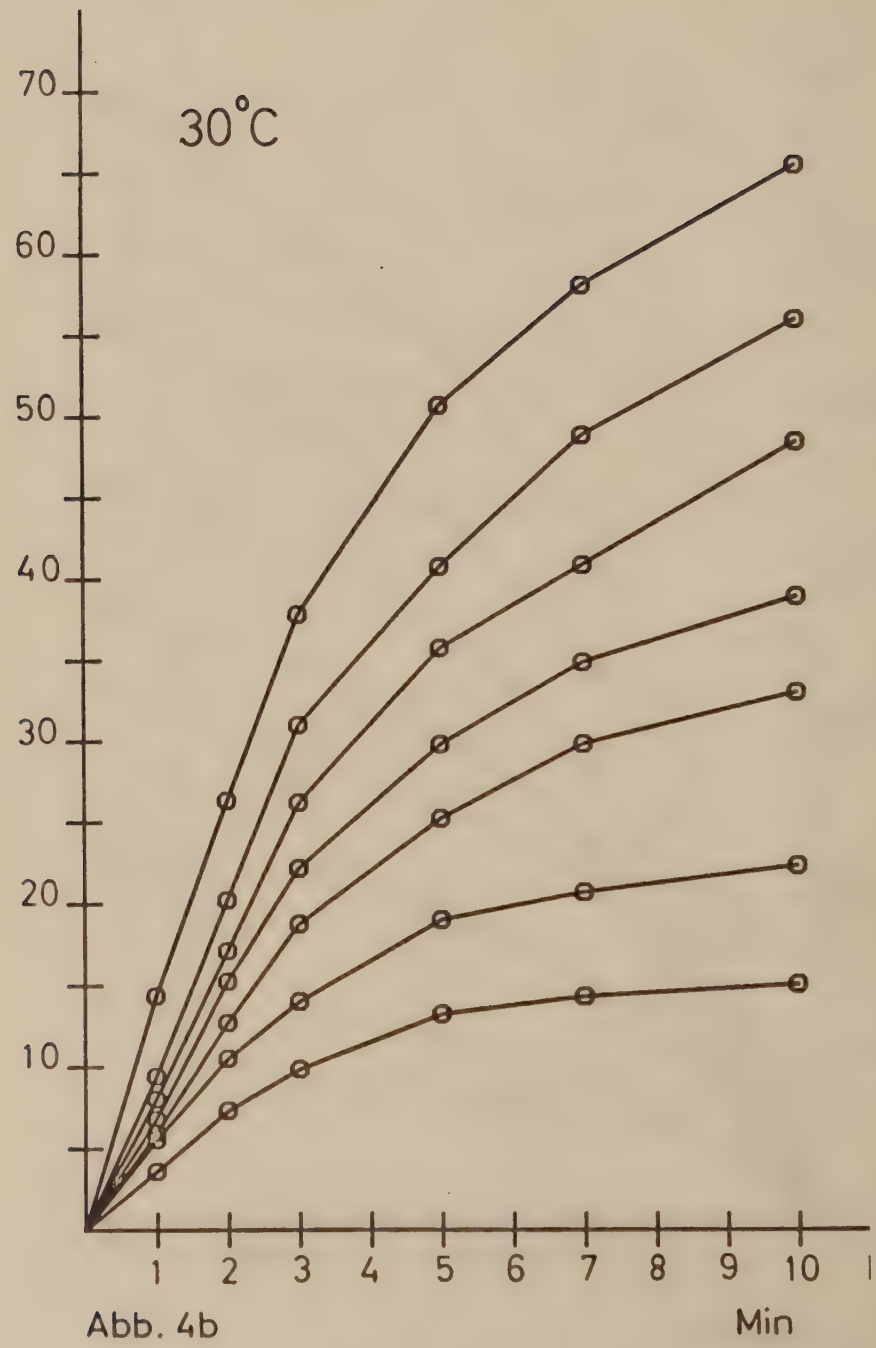


Abb. 4b

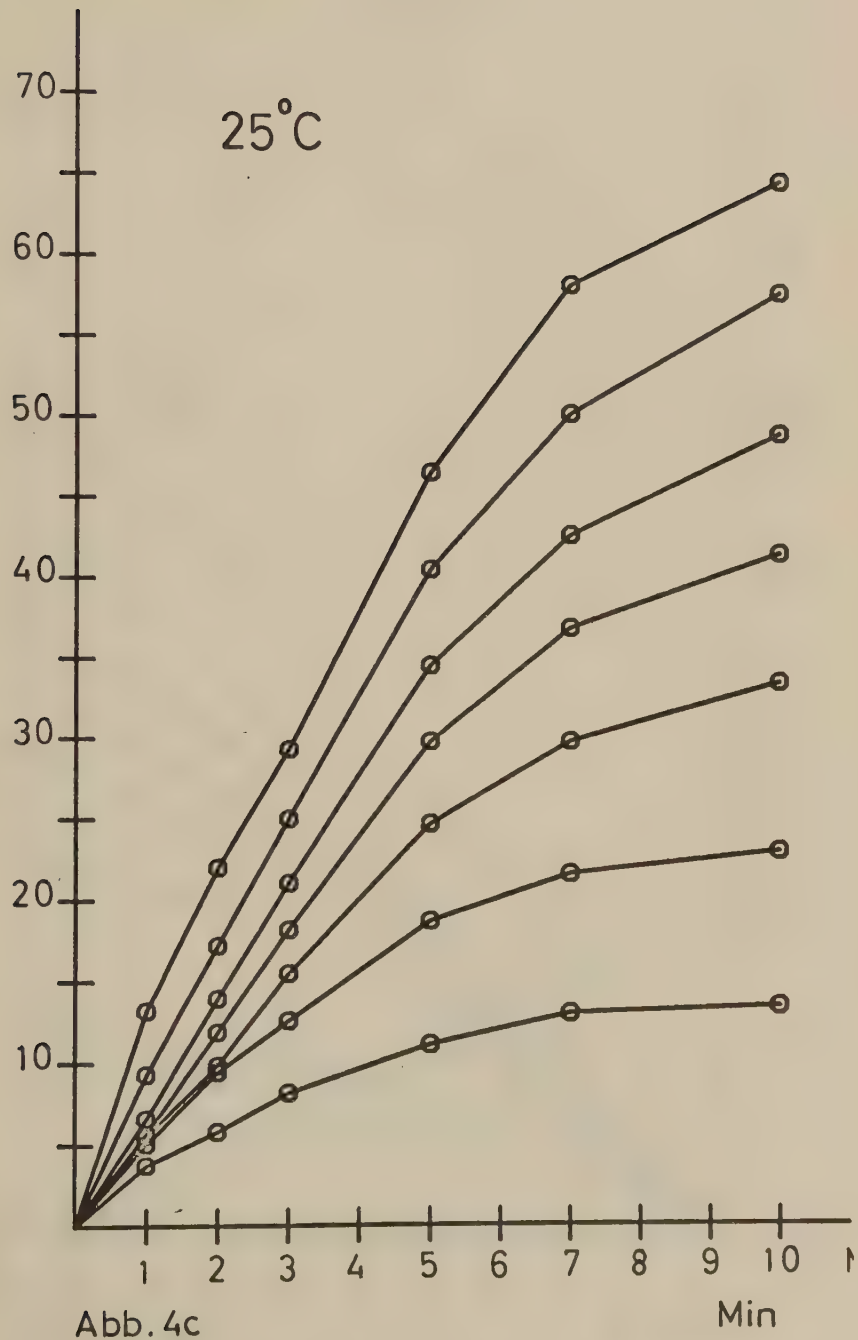


Abb. 4c

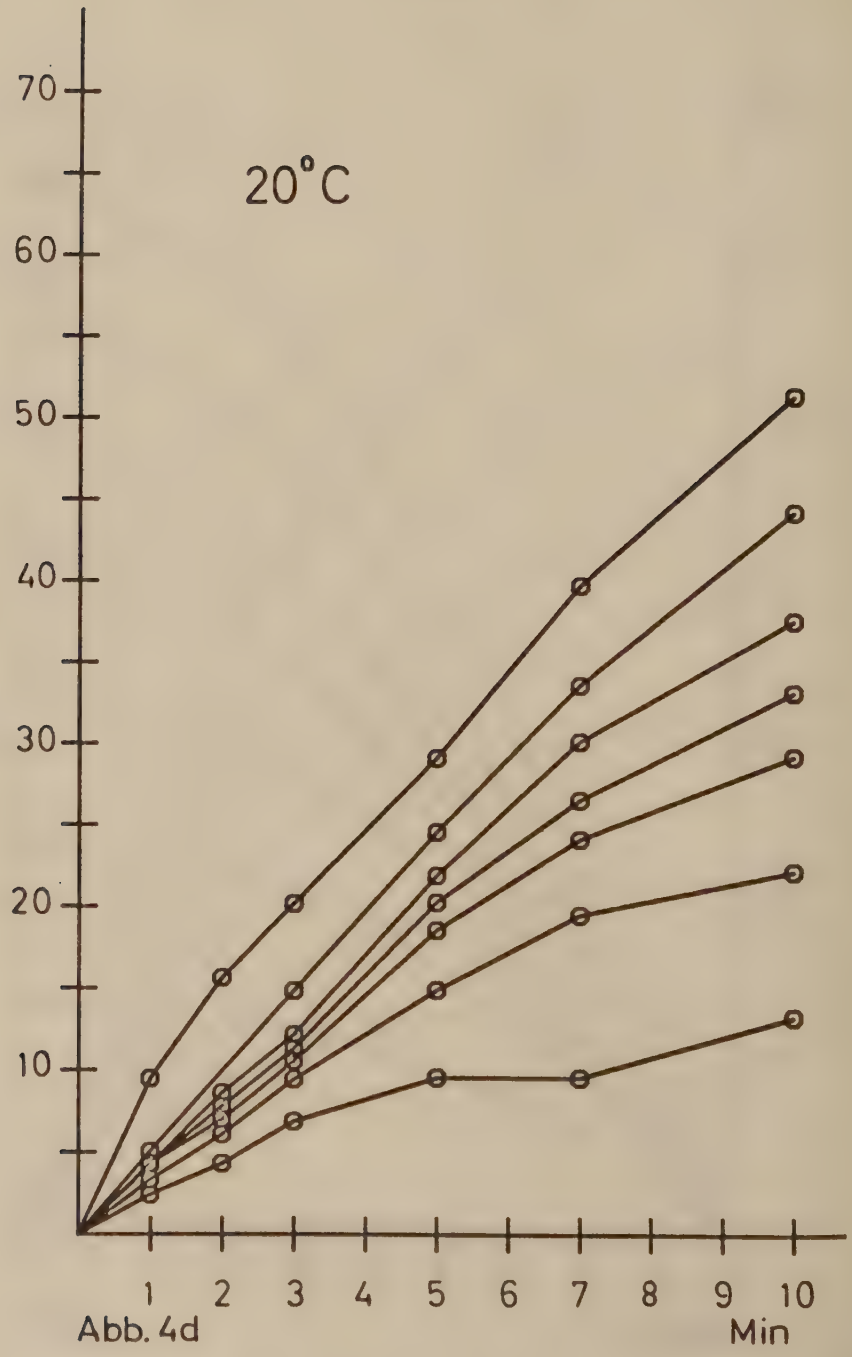


Abb. 4d

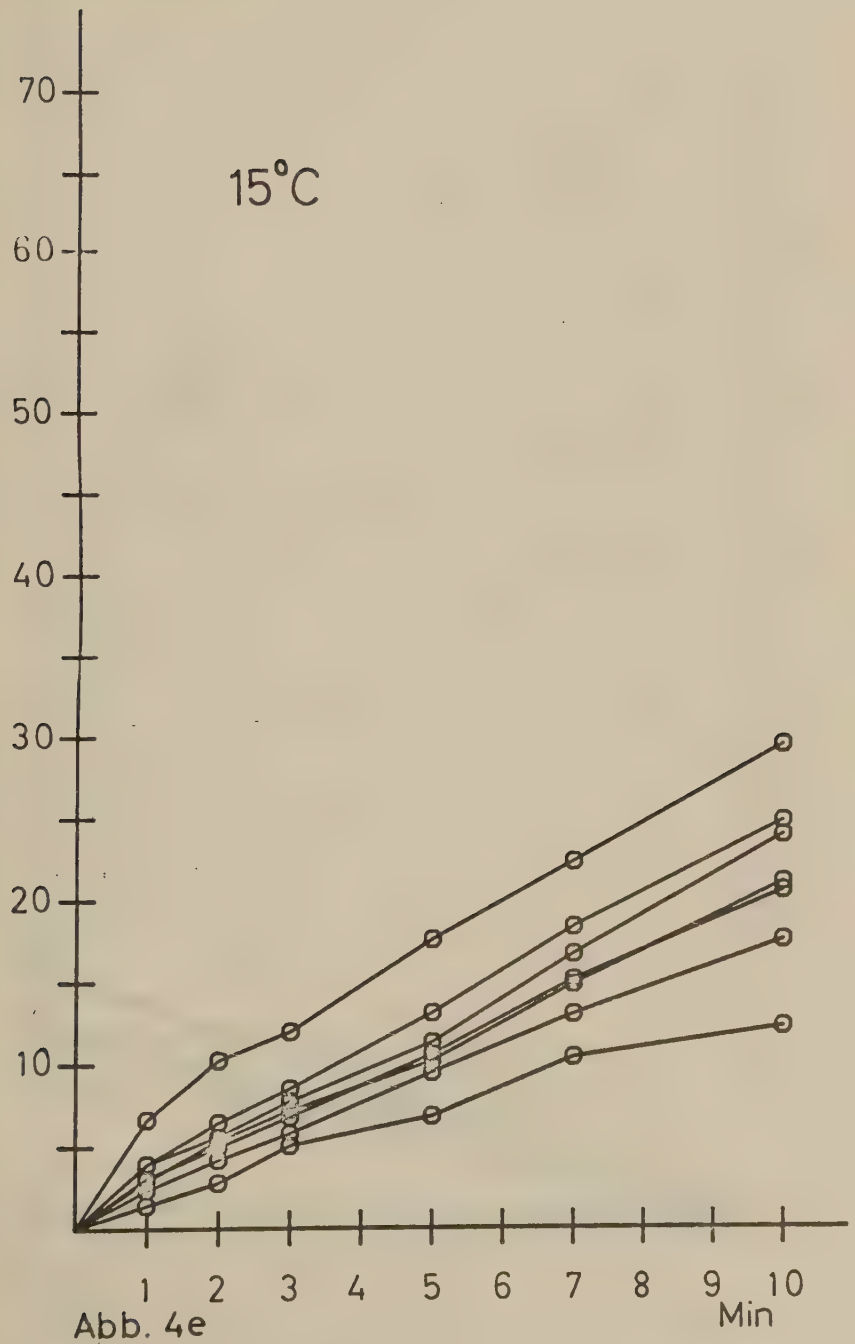


Abb. 4e

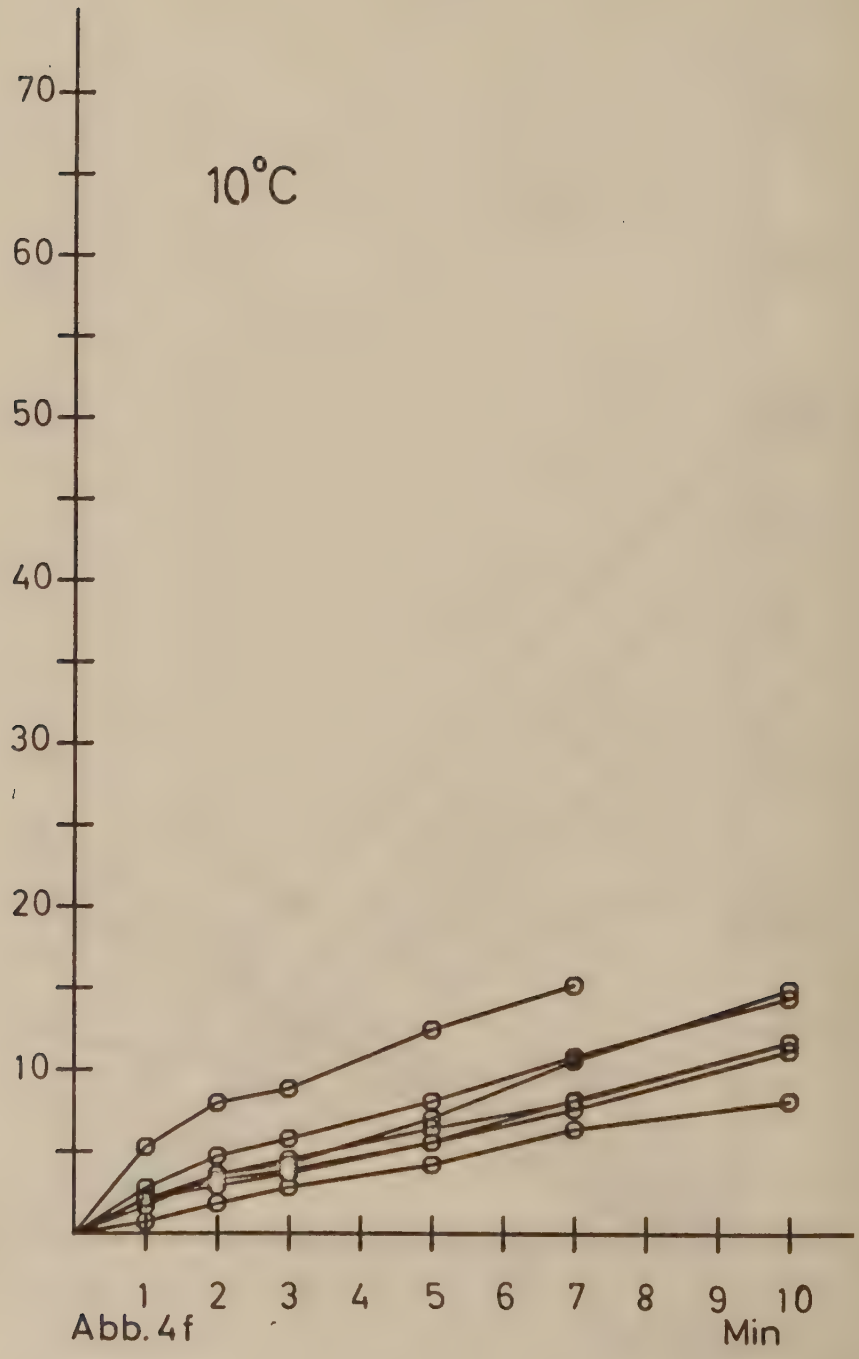


Abb. 4f

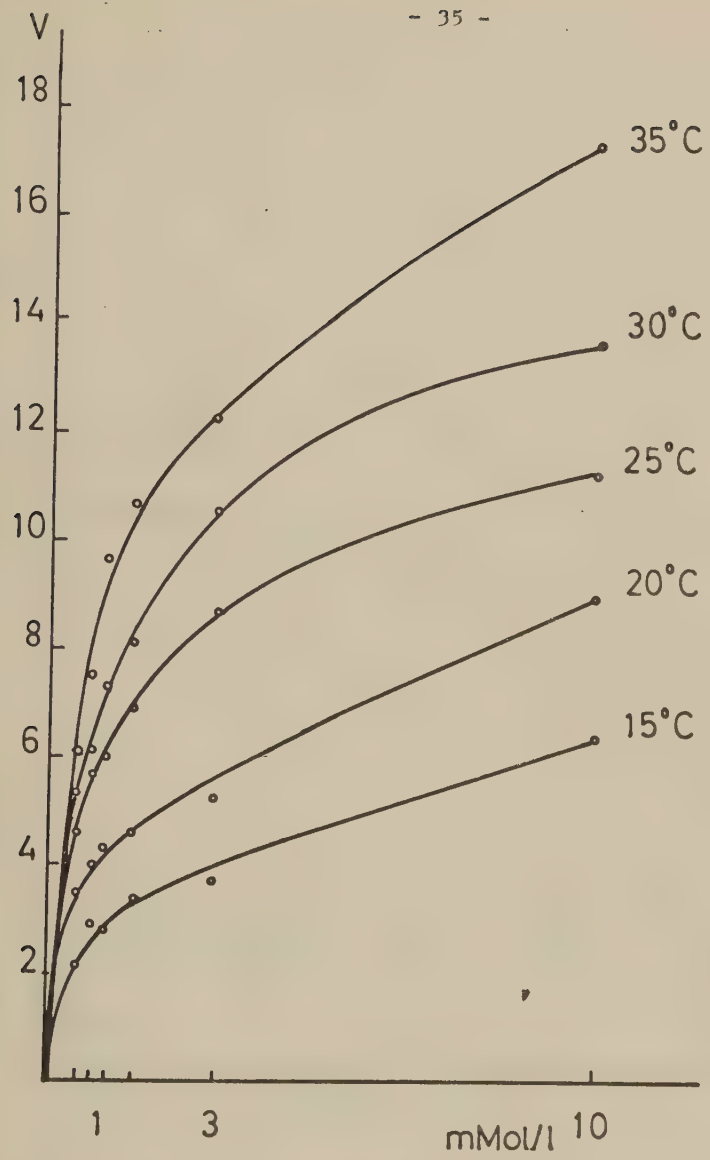


Abb.: 5

Initialgeschwindigkeiten V(mMol/kg Zellen · Minute) in Abhängigkeit von der Außenkonzentration und der Temperatur.

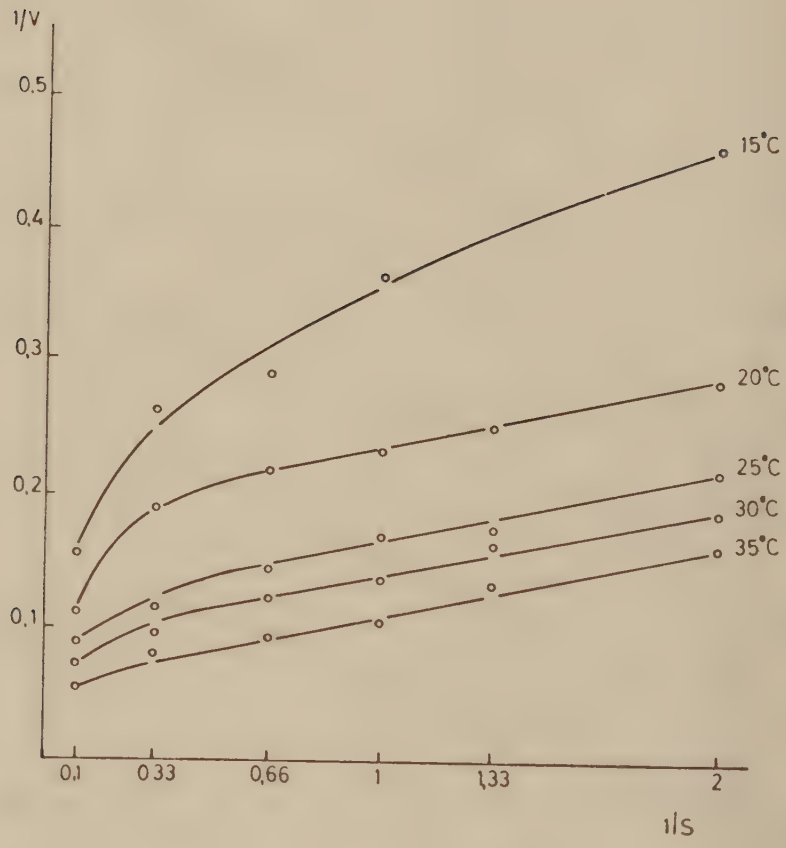


Abb.: 6

Doppelt reziproke Auftragung der Initialgeschwindigkeiten aus Abb. 5.

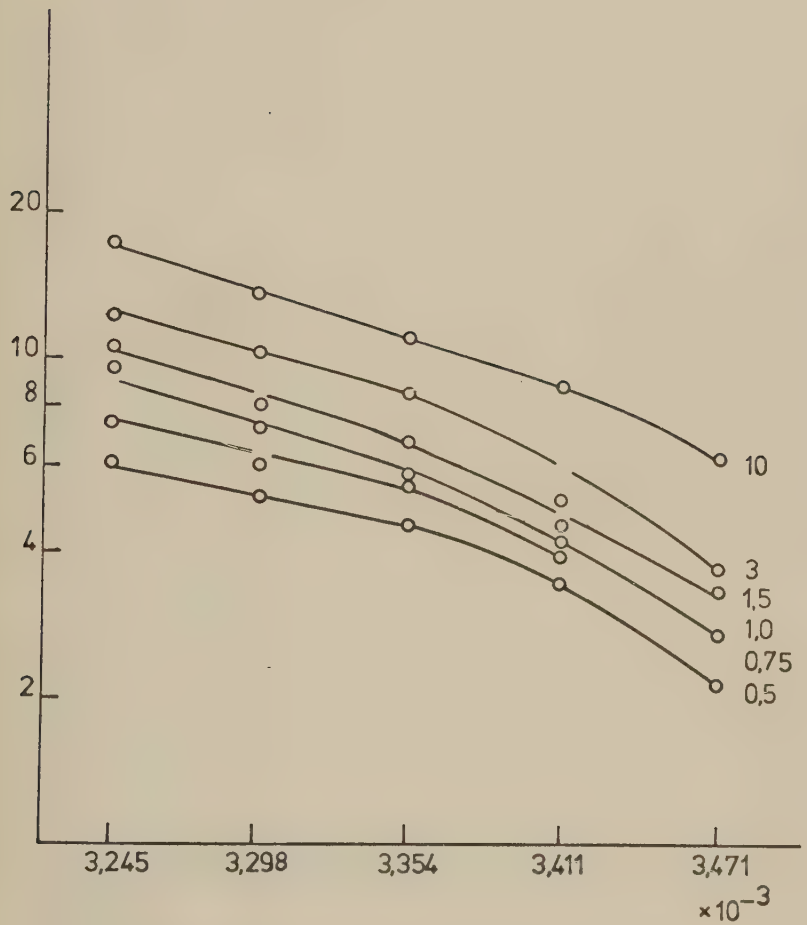


Abb.: 7

Arrhenius Auftragung der Initialgeschwindigkeit bei verschiedenen Rubidiumkonzentrationen.

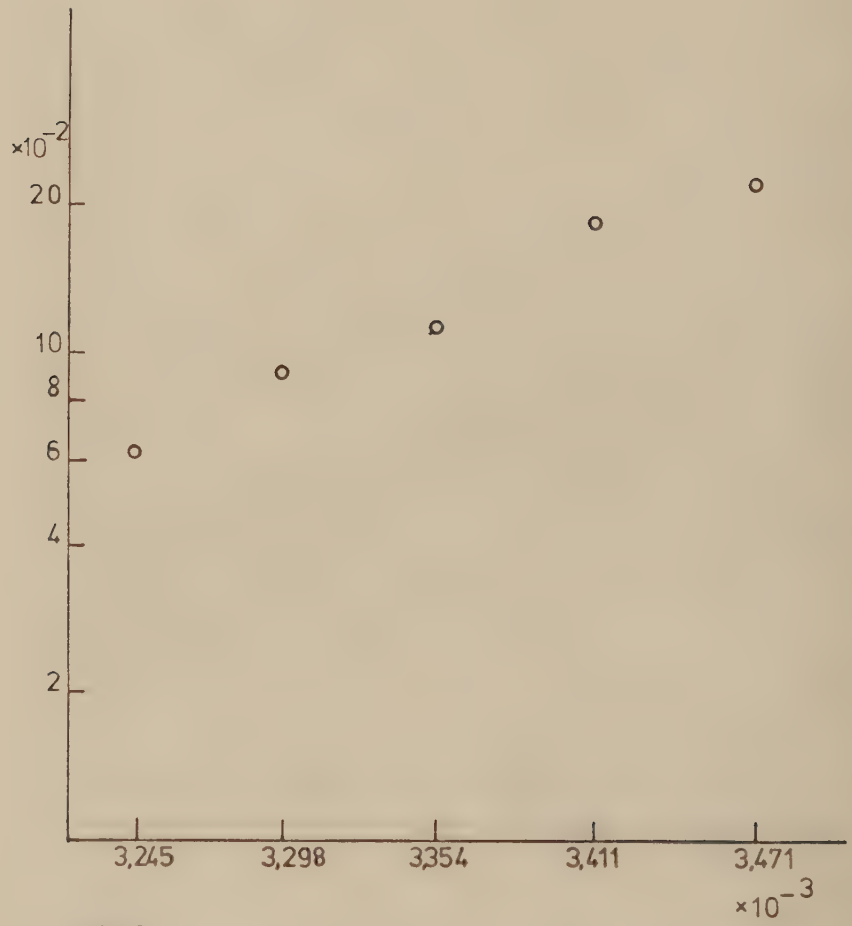


Abb.: 8

Arrhenius Auftragung des Achsenabschnittes der geraden Anteile im Lineweaver-Burk-Plot.

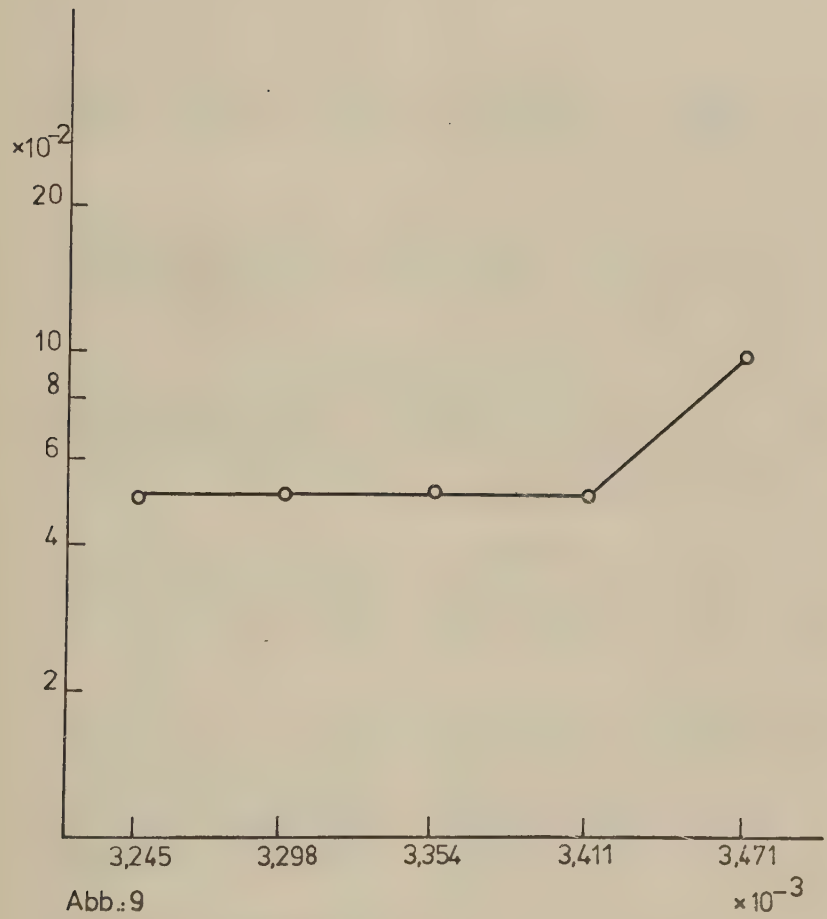


Abb.: 9

Arrhenius Auftragung der Neigung des geraden Anteils im Lineweaver-Burk-Plot.

Z U S A M M E N F A S S U N G

In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluß der Temperatur auf Beladung und Transfer des Alkali-Carriers der Hefezelle untersucht.

Als Testion diente Rubidium, dessen Aufnahme in die Zelle bei verschiedenen Außenkonzentrationen in einem Temperaturbereich zwischen 10° und 35°C gemessen wurde.

Es zeigte sich, daß der Zellstoffwechsel zunächst durch Zugabe von Glucose in Gang gebracht werden muß, ehe das zu transportierende Ion zugegeben werden darf. Nur so kann die für jede Temperatur und jede Konzentration maximal mögliche Anfangsgeschwindigkeit erhalten werden.

Als Ergebnis wurde gefunden, daß $\Delta E_1 = \Delta H_1$ ist, d.h. daß die stärkere Dissoziation des Carriers bei hohen Temperaturen durch eine Verkürzung der Oszillationszeit des beladenen Carriers kompensiert wird.

Das Ergebnis konnte nur dadurch erhalten werden, daß das von ARMSTRONG und ROTHSTEIN für Inhibitorexperimente entwickelte Zweiplatz-Konzept unter Wegfall einschränkender Annahmen quantitativ formuliert wurde. Anhand dieser Transportgleichung wird das Carrier-Modifier-Modell eingehend diskutiert.

LITERATURVERZEICHNIS

1. ALBERTY, R.A. und BOCK, R.M. — Alteration of the kinetic properties of an enzyme by the binding of buffer, inhibitor, or substrate. Proc. Nat. Acad. Sc. 39, (1953): 895-900

2. ALBERTY, R.A., MASSAY, V. und FRIEDEN, C. und FUHLBRIGGE, A.R. — Studies of the Enzyme Fumarase III. The dependence of the kinetic constants at 25° upon the concentration and pH of phosphate buffers. J. Am. Chem. Soc. 76, (1954): 2485-2493

3. ARMSTRONG, W. McD. und ROTHSTEIN, A. — Discrimination between alkali metal cations by yeast. I. Effect of pH on uptake. J. Gen. Physiol. 48, (1964): 61-71

4. ARMSTRONG, W. McD. und ROTHSTEIN, A. — Discrimination between alkali metal cations by yeast. II. Cation interactions in transport. J. Gen. Physiol. 50, (1967): 967 - 988

5. ARRHENIUS, S. — Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säuren. Z. physik. Chem. 4, (1889): 226-248

6. CONWAY, E.J. und DOWNEY, M. — An outer metabolic region of the yeast cell. Biochem. J. 47, (1950): 347-355

7. CONWAY, E.J. und DOWNEY, M. — pH values of the yeast cell. Biochem. J. 47, (1950): 355-360

8. CONWAY, E.J. und DUGGAN, F. — A cation carrier in the yeast cell wall. Biochem. J. 69, (1958): 265 - 274

9. DIXON, M. und WEBB, E.C.
Enzymes
Acad. Press, New York (1958)

10. FRIEDEN, C.
Treatment of enzyme kinetic data. I. The effect of modifiers on the kinetic parameters of single substrate enzymes.
J. Biol. Chem. 239, (1964): 3522-3531

11. GIBSON, K.D.
True and apparent activation energies of enzymic reactions.
Biochim. Biophys. Acta 10, (1953): 221-224

12. HERRMANN, R. und ALKEMADE, C. Th.
Flammenphotometrie.
Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg (1960)

13. HUNTER, A. und DOWNS, C.E.
The inhibition of arginase by amino acids.
J. Biol. Chem. 157, (1945): 427

14. LAIDLER, K.J.
The chemical kinetics of enzyme action.
Oxford Univ. Press (1958)

15. LINEWEAVER, H. und BURK, D.
zitiert nach WESTLEY, J.
J. Am. Chem. Soc. 56, (1934): 658

16. PASSOW, H. und STÄMPFLI, R. Ed.
Laboratory techniques in membrane biophysics. An introductory course.
Springer Verlag, Berlin, New York (1969)

17. ROTHSTEIN, A. und ENNS, H.
The relationship of potassium to carbohydrate metabolism in baker's yeast.
J. Cell. Comp. Physiol. 28, (1946): 231-252

18. ROTHSTEIN, A. und BRUCE, M.
The potassium efflux and influ in yeast at different potassiu concentrations.
J. Cell. Comp. Physiol. 51, (1958): 145-159

19. ROTHSTEIN, A. und BRUCE, M. — The efflux of potassium from yeast cells into a potassium free medium. J. Cell. Comp. Physiol. 51, (1958): 439-455

20. ROTHSTEIN, A. — Relationship of the cell surface to electrolyte metabolism in yeast. Electrolytes in biological systems, ed. by A. SHANES, Am. Physiol. Soc., Wash. (1955)

21. WEBB, J.L. — Enzyme and metabolic inhibitors, Vol. I. Academic Press, Inc. N.Y. (1963)

22. WESTLEY, J. — Enzymic catalysis. Harper and Row, Publ. N.Y., London, (1969)

D A N K S A G U N G

Ich danke Herrn Professor Passow für die Überlassung dieses interessanten Themas und die vielen wertvollen Hinweise und Diskussionen.

Den Institutskollegen danke ich ebenfalls für viele kritische Diskussionen. Besonders bin ich Herrn Dr. Nonner verpflichtet für seine bereitwillige Hilfe beim Benutzen des Computers.

L E B E N S L A U F

Wolfgang Fuchs, geb. am 10.3.1943 in Neunkirchen/Saar

Eltern:	August Fuchs und Ehefrau Mathilde, geb. Fried
Schulen:	Ev. Volksschule Neunkirchen von September 1949 bis Juli 1953
	Staatliches Knabenrealgymnasium Neunkirchen vom 31.8.53 bis 10.3.62
	Abitur am 10.3.1962
Studium:	Universität des Saarlandes seit SS 1962
	Vorphysikum im Februar 1963
	Physikum im Oktober 1964
	Staatsexamen im Dezember 1967
	Seitdem Assistent am II. Physiologischen Institut der Universität des Saarlandes in Homburg.